

**Prevalencia y factores de riesgo para leucosis enzoótica bovina en ganado
Blanco Orejinegro (BON) de Colombia, 2018**

Katherine Mejía Cuadros.

Trabajo de grado para optar al título de Medica Veterinaria y Zootecnista.

Asesor

Juan Carlos Rincón Flórez.

Universidad Tecnológica de Pereira.

Facultad de Ciencias de la Salud.

Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Pereira (Risaralda), 2019

Prevalencia y factores riesgo para leucosis enzoótica bovina en ganado Blanco Orejinegro (BON) de Colombia, 2018

Prevalence and risk factors for bovine enzootic leukemia in White Orejinegro (BON) cattle from Colombia, 2018

Mejía-Cuadros K¹, Rincón JC²

¹ Estudiante Grupo de investigación Producción Pecuaria Sostenible. Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Facultad Ciencias de la Salud, Pereira, Risaralda, Colombia. ²Profesor (Asesor), Grupo de investigación Producción Pecuaria Sostenible. Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Facultad Ciencias de la Salud, Pereira, Risaralda, Colombia. ²Profesor

Resumen

La leucosis es una enfermedad viral que causa pérdidas económicas importantes en la producción bovina, sin embargo, los ganados criollos han sido considerados como más resistentes. Sin embargo, no hay numerosos reportes ni de la prevalencia ni de factores de riesgo asociados a esta raza en el país. El objetivo de este trabajo fue determinar las prevalencias y los factores de riesgo asociados a la presencia del virus de la leucosis enzoótica bovina en ganado Blanco Orejinegro (BON) de Colombia, 2018. Para esto se tomó información productiva de 9 hatos y de factores como Sexo, Años nacimiento, época de nacimiento, y el nombre del hato para evaluar como factores de riesgo. De cada producción se tomó una muestra aleatoria para un total de 132 animales, a los cuales se les colectó una muestra de sangre por punción de la vena coccígea y se transportó al laboratorio múltiple de ciencias animales de la universidad Tecnológica de Pereira, donde se realizó la extracción de ADN con el kit GeneJET (Thermo Scientific). Posteriormente, se estandarizó una PCR anidada para la detección del gen env del virus. A partir de la positividad se calculó la prevalencia con el respectivo intervalo de confianza del 95%, se

realizó un análisis descriptivo de la muestra y se estableció el riesgo mediante un modelo de regresión logística y análisis de Odds Ratio usando el software R. Se encontró una prevalencia de 8.5%.

Palabras clave: retrovirus, PCR anidada, Sanidad bovina, Ganado Criollo

Abstract

Leukemia is a viral disease that causes significant economic losses in bovine production, however, Creole cattle have been affected as more resistant. However, there are no reports of the prevalence or risk factors associated with this breed in the country. The objective of this work was to determine the prevalence and risk factors associated with the presence of bovine enzootic leukemia virus in White Orejinegro (BON) cattle from Colombia, 2018. This requires productive information of 9 herds and factors such as Sex, Years of birth, Time of birth and The name of the herd to evaluate as risk factors. From each production a random sample is required for a total of 132 animals, to which a blood sample was collected by puncture of the coccygeal vein and transported to the multiple laboratory of animal sciences of the Technological University of Pereira, where it was performed DNA extraction with the GeneJET kit (Thermo Scientific). Subsequently, a nested PCR was standardized for the detection of the env gene of the virus. From the positivity the prevalence is calculated with the respective 95% confidence interval, a descriptive analysis of the sample is performed and the risk is determined using a logistic regression model and Odds Ratio analysis using the R software. a prevalence of 8.5%.

Key words: Retrovirus, nested PCR, Bovine sanity, Creole Bovine.

Introducción

La leucosis enzoótica bovina (LBE) es una enfermedad viral causada por el virus de la leucosis bovina (VLB), perteneciente a la familia *retroviridae*, de alta transmisibilidad, esta patología sintetiza una copia de ADN por medio del ARN viral, luego de sintetizado, el

ADN se incorpora en el genoma del hospedero y se establece en los núcleos celulares; una vez perpetuada la enfermedad, no se consigue ser eliminada del organismo, quedando los animales como portadores asintomáticos de por vida (1).

Esta patología afecta a bovinos de todas las edades y causa grandes pérdidas económicas en diferentes ganaderías; a pesar que esta enfermedad causa un impacto en la productividad de los animales, se ha creído durante mucho tiempo que el ganado blanco orejinegro (BON) es resistente a algunas patologías y que puede presentar menores prevalencias, sin embargo, no hay estudios masivos en todo el país que lo demuestren, por lo que es necesario desarrollar este tipo de trabajos.

Su transmisión puede darse por consumo de leche, vectores hematófagos, transmisión vertical (madre a hijo), transmisión horizontal (bovino a bovino) o iatrogénica (provocado por un acto médico). No se conoce ningún tratamiento por el momento, pero se puede prevenir haciendo un control serológico a animales nuevos y establecidos en la finca periódicamente, control de vectores hematófagos, utilización de una aguja por animal y descartar animales enfermos (2).

Las pérdidas económicas se presentan al ocasionarse muerte súbita en los ejemplares, sustitución de individuos infectados, baja producción en ganaderías lecheras o por tratamientos en los vacunos con inducción de trastornos y deficiencias en el sistema inmunológico, que acarrearán otras enfermedades oportunistas posibilitando la degeneración de la homeostasis animal (3).

Los primeros estudios de la leucosis bovina tuvieron origen en 1871 en Alemania, obtenidas por Leisering. Después de la segunda guerra mundial se proliferó la enfermedad con tumoraciones en Alemania y otros países de Europa. Gracias a exportaciones desde las costas del Mar Báltico a EEUU se expandió la enfermedad a América, especialmente en el ganado lechero (4).

Colombia es un país con enormes facultades para el desarrollo de la producción pecuaria. Estudiar la prevalencia y factores de riesgo de la raza criolla colombiana Blanco Orejinegro (BON) frente a la leucosis enzoótica bovina (LBE) es muy importante, pues de

esto depende la implementación de programas de prevención y control de esta patología, para el mejoramiento de la salud y producción en el sector ganadero.

Por esta razón es necesario investigar sobre la predisposición de LBE en el ganado BON, y así mismo mejorar la rentabilidad de las pequeñas, medianas y grandes empresas en la industria bovina.

Esta raza tiene mayor influencia en estribaciones de las tres cordilleras, región central andina y zona cafetera de clima medio en el centro del país; se ha adaptado a lugares topográficamente abruptos, con presencia de suelos ácidos y deficiencia de algunos minerales. Generalmente son ejemplares de temperamento dócil, aportan vigor híbrido, gran adaptabilidad y resistencia, capaces de pastorear en zonas rocosas o con fuertes desniveles, tienen buena habilidad reproductiva, sobrevivencia en zonas tropicales, aprovechan forrajes toscos con escaso valor nutritivo y son considerados como animales de carne, leche y trabajo (5).

El ganado blanco orejinegro o BON se caracteriza por pelaje blanco con orejas negras, piel gruesa y mucosas bien pigmentadas que favorecen su resistencia al calor y a diferentes ectoparásitos como lo son los nuches (*Dermatobia hominis*) y las garrapatas (*Ixodoidea*). Existen otras investigaciones que aseguran que la raza BON presenta inmunidad a infecciones virales tales como el virus de fiebre aftosa (FMDV) y estomatitis vesicular (VSV), pero también hay reportes de tolerancia de estos vacunos frente a infecciones bacterianas como la brucelosis (*Brucella abortus*), asimismo se ha determinado concurrencia de alelos de resistencia a la infección por el virus de la leucemia bovina (VLB) (5).

Según el primer estudio que se hizo para detectar la LBE en el país, manifiesta las razas criollas colombianas con menores promedios de infección (26,7%), seguida por las razas extranjeras (45,0%) y siendo las razas criollas sintéticas las de mayor porcentaje infeccioso (50,0%); a su vez indica que son las hembras las que tienen mayor número de resultados positivos y encontrándose las razas criollas como BON, Sanmartinero y Romosinuano como animales libres de esta enfermedad (1).

Otra investigación realizada por la Universidad de Ciencias Aplicadas, señala que la industria lechera es la más propensa a contraer LBE en el país, dando como resultado el 50,7% de animales positivos, siendo la producción de doble propósito la siguiente con un 15% y tipo carne con promedio de 5.6% (6).

De acuerdo a lo anterior, el objetivo del presente estudio fue determinar la prevalencia y algunos factores de riesgo para leucosis enzoótica bovina en ganado Blanco Orejinegro (BON) de Colombia, 2018

Materiales y métodos

Se tomaron muestras de sangre en 130 animales seleccionados al azar de la raza Blanco orejinegro de 9 hatos diferentes, que estaban vinculados al proyecto “Conociendo nuestros recursos Criollos: análisis genómico y búsqueda de regiones del genoma asociadas a características productivas, reproductivas y de salud en ganado blanco orejinegro (bon)”, con código: 110177658049. De cada uno de los individuos se tomaron una muestra de sangre de la vena coccígea usando tubos BD vacutainer, usando EDTA como anticoagulante, con agujas número 18, previa desinfección de la zona con alcohol antiséptico.

Una vez obtenidas las muestras de sangre, fueron transportadas en neveras portátiles hasta el laboratorio múltiple de Ciencias Animales, donde se realizó la centrifugación y separación de sueros. Posteriormente, se usaron 300ul de sangre para realizar la extracción de ADN mediante el kit comercial Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit #K0722, siguiendo las indicaciones del fabricante. Las muestras se almacenaron a 4°C hasta el momento del análisis.

Posteriormente se estandarizó una prueba de PCR de acuerdo con las condiciones y cebadores reportados por (7), para esto, se efectuó la amplificación del gen env (gp51) viral por PCR donde se obtuvo un fragmento de 597 pares de bases en las vacas positivas, usando topTaq Polymerase (Qiagen®) y los cebadores externos F (5'-ATGCCYAAA GAACGACGG-3 ') y externo R (5'-CGACGG GACTAGGTCTCGACCC-3'),

0,4 mM de dNTPs, 1X de tampón PCR (ThermoScientific), 3 mM MgCl₂ y 1U de Taq DNA Polimerasa. En la segunda reacción de PCR se utilizó como DNA molde 3µl del producto de PCR de la primera amplificación, pero las mismas concentraciones de los otros reactivos y usando los primeros internos Env5032 (5'-TCTGTGCCAAGTCTCCCAGATA-3') y Env5608r (5'-AACAACAACCTCTGGGAAGGGT-3'). Tanto en la primera PCR como en la segunda se consiguió un volumen total o final de 25µl.

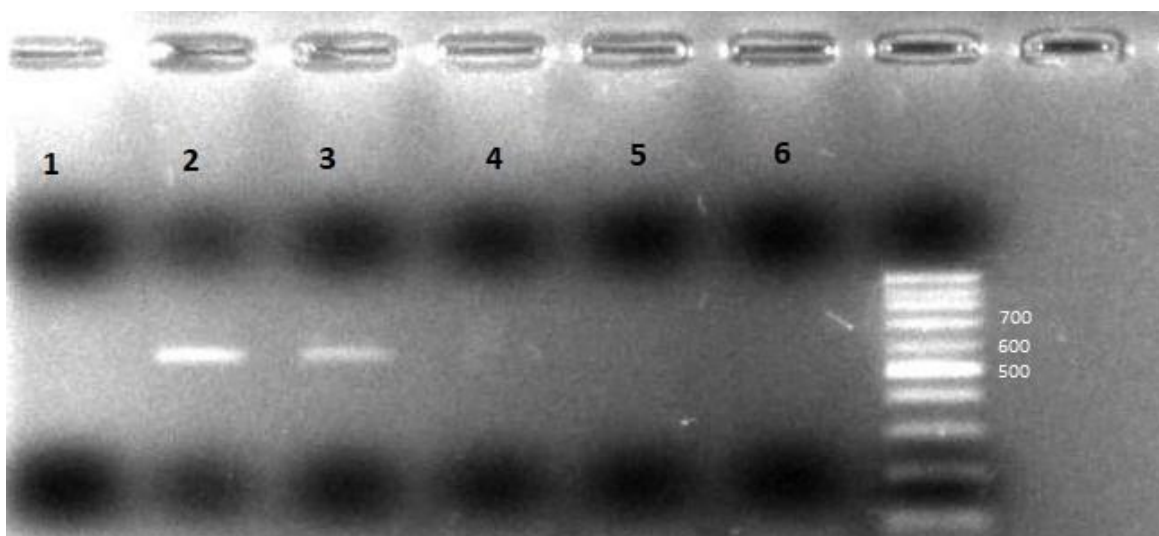
La PCR se realizó en un termociclador MultiGene™ OptiMax (Labnet®, CA, USA) con el perfil de amplificación: 98 ° C durante 2 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 98°C durante 15 s, recocido a 60°C durante 20 s y extensión a 68°C durante 60 s. Los cebadores externos amplifican un fragmento de ADN de 913 pb, y los cebadores internos amplificaron un fragmento de 597 pb de la región gp51 del gen env. Para identificar los fragmentos, se realizó el procedimiento de electroforesis en gel de agarosa al 2% y se emplearon 5ul del producto de la PCR final. Las muestras fueron teñidas con EZ-visión y posteriormente los geles se visualizaron en un fotodocumentador de geles (Labnet Enduro®, GDS &GDS, CA, USA) para tomar el respectivo registro fotográfico.

Una vez obtenidos los resultados, se tomó la información del sexo, la finca y año y época de nacimiento de los animales y se llevó cabo un análisis a de estadística descriptiva. Para las frecuencias, se estimó los intervalos de confianza del 95% y se realizó el análisis de riesgo mediante un modelo de regresión logística.

Resultados y discusión

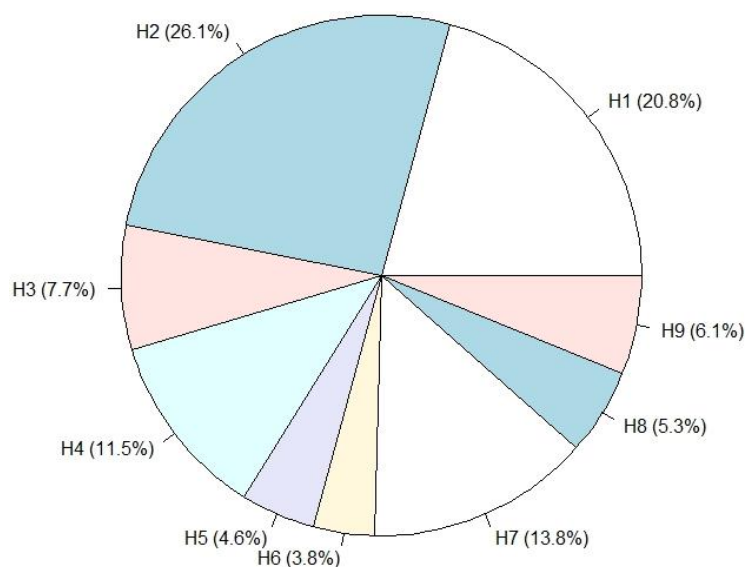
A partir de los datos tomados, se pudo estandarizar adecuadamente una PCR para el virus de la leucosis bovina como se muestra en la figura 1, presenta los resultados en el siguiente orden: el carril numero 1 corresponde al control negativo, el carril numero 2 corresponde al control positivo y en los demás carriles (3-6) se encuentran las muestras tomadas, sólo el carril 3 es una muestra positiva, con un fragmento amplificado entre las 500 y 600 pares de bases.

Figura 1: electroforesis en gel de agarosa para el virus de la leucosis bovina.



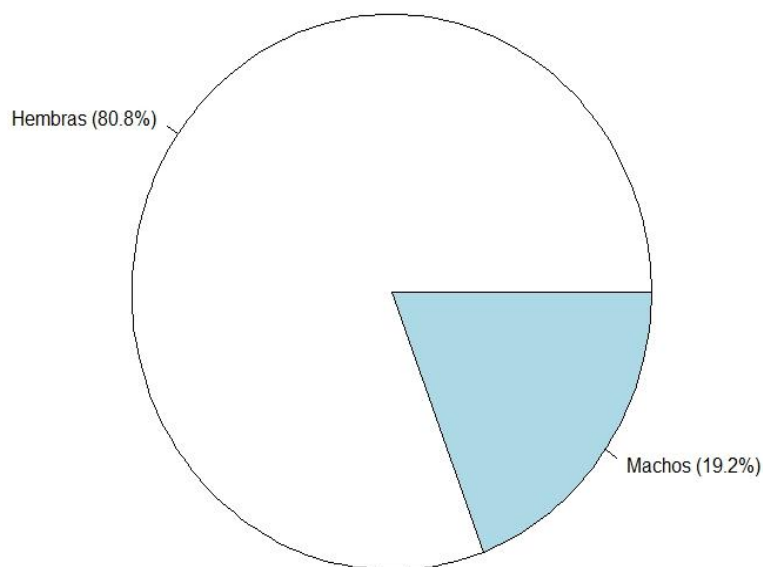
Posteriormente, con información tomada de las fincas, se procedió a hacer un análisis descriptivo, donde se pudo identificar que la mayoría de los individuos venían de 3 hatos principalmente que son: Hato 1 con 27 individuos (20.8%), Hato 2 con 34 individuos (26.1%) y Hato 7 con 18 individuos (13.8%) respectivamente, sumando un total de 79 individuos (60.7%) como se representa en la figura 2.

Figura 2: animales muestreados por hatos.



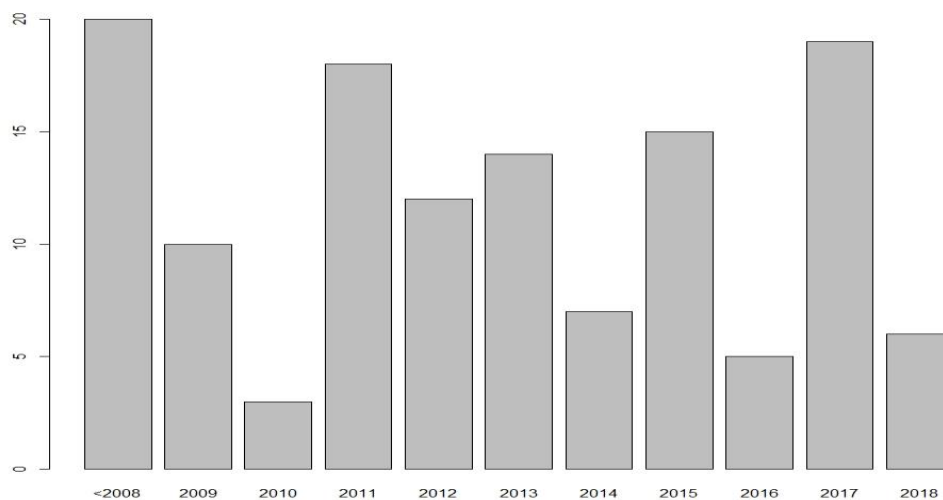
Si bien, se pudo conocer que la mayoría de los animales eran hembras representando el 80.8% y la minoría de los animales machos representando el 19.2% como se ve en la figura 3.

Figura 3: animales muestreados por sexo.



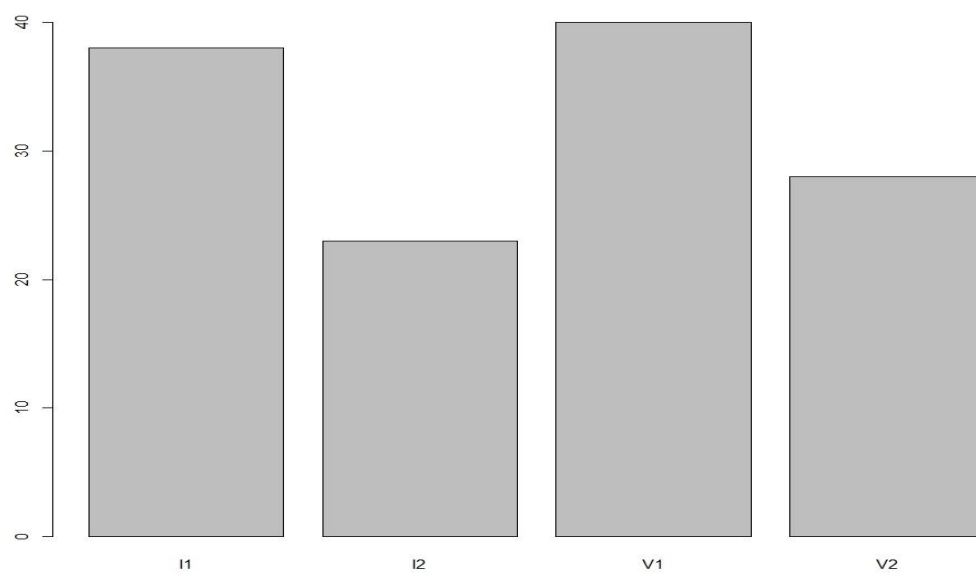
Adicionalmente, los años de mayor número de animales nacidos fueron antes del 2008, 2011 y 2017 como esta en la figura 4.

Figura 4: cantidad de nacimientos para cada año en el ganado BON muestreado.



Seguidamente, se pudo observar que las épocas del año no tuvieron una diferencia significativa en cuanto a los nacimientos de los individuos como se muestra en la figura 5.

Figura 5: cantidad de nacimientos por épocas del año en ganado BON.



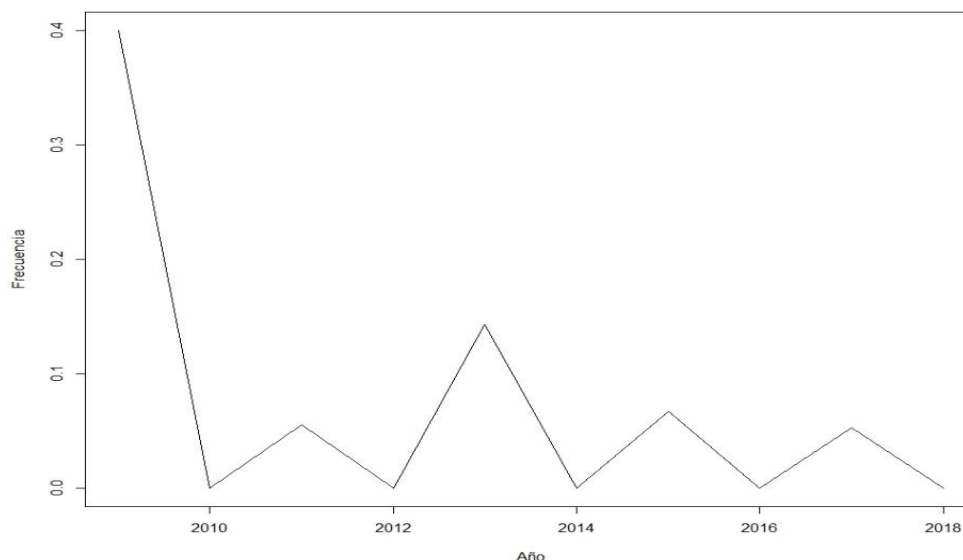
invierno 1 (I1) de abril a junio, invierno 2 (I2) de octubre a diciembre, verano 1 (V1) de enero a marzo y verano 2 (V2) de julio a septiembre.

Posteriormente, a partir de las 130 muestras tomadas, se procedió a estimar la prevalencia con un valor de 8.5%, y con un intervalo de confianza del 95%, que va desde 4.5 a 15.0%.

Finalmente, con la información de 67 animales pesados al destete en los diferentes hatos se obtuvo una media de 205.95kg, con un error estándar de 5.26kg, estando el verdadero valor de la media entre 200.69kg y 211.21kg.

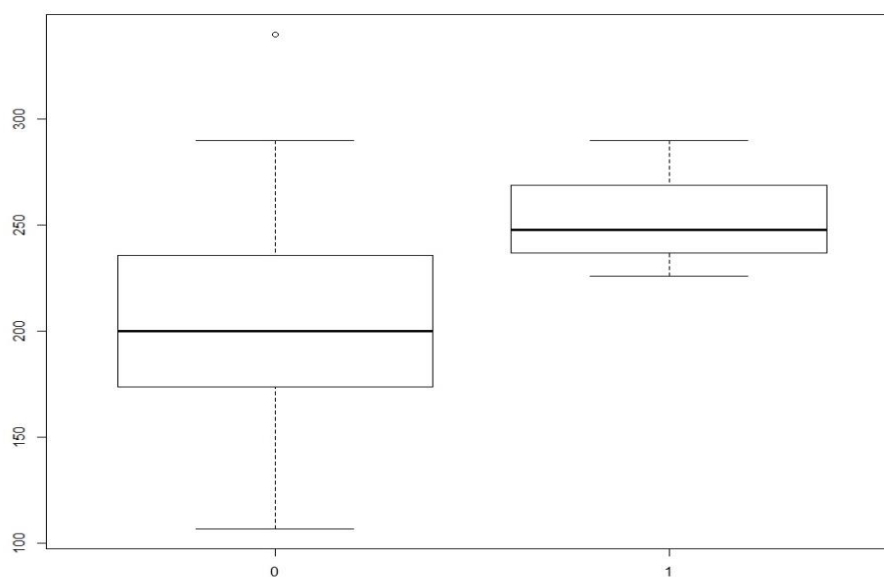
Posteriormente se pasó a evaluar los factores de riesgo y en los resultados no se encontró diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la finca, sexo y época. Mientras se presentó una diferencia significativa en cuanto al año, con mayor prevalencia en los animales nacido antes del 2009, siendo esta del 40% como se muestra en la figura 6.

Figura 6: promedio de animales infectados a lo largo de los años.



Seguidamente, se quiso evaluar el efecto de la positividad sobre el peso del destete, donde se encontró un efecto estadísticamente significativo, obteniendo los animales infectados una media de 254.67kg y un error estándar de 18.77kg, y los animales no infectados una media de 203.66kg y un error estándar de 5.29kg como se muestra en la figura 7.

Figura 7: efecto de la positividad sobre en peso al destete.



Discusión

Una investigación realizada anteriormente sobre la raza criolla Romosinuano muestra que el peso al destete oscila entre 182.21kg y 183.55kg (8), mientras que otro reporte sobre la raza Sanmartinero conto con un promedio de 161.09kg (9), y en el noroccidente colombiano muestra un peso promedio al destete de la raza BON entre 164.9kg y 227.7kg (10). En el presente estudio, se puede interpretar entonces, que el resultado promedio obtenido de los animales negativos se encuentran entre el rango normal de peso al destete estando entre 198.37kg y 208.66kg, mientras que los animales positivos presentaron un resultado estadísticamente significativo con promedio más alto entre 235.90kg y 273.44kg; sin embargo, este resultado no es extremadamente alto, esto podría haberse presentado por un efecto del azar o cantidad baja de individuos muestreados, por lo que se recomienda tomar con precaución la interpretación de los resultados obtenidos.

Las razas criollas colombianas se han considerado como una familia con gran capacidad de tolerancia hacia diferentes enfermedades, en especial el ganado blanco orejinegro (BON) (11); un estudio realizado sobre la prevalencia de la leucosis enzoótica bovina (LBE) en diferentes razas criollas colombianas obtuvo los siguientes resultados: Hartón del Valle 83.3%, Chino santandereano 60%, Casanareño 26.7%, Costeño con Cuernos 23.3%, Caqueteño 16.7%, sin embargo las razas San Martinero, Romosinuano y BON no presentaron positividad a esta patología (1), en diferentes explotaciones ganaderas de Colombia se obtuvo una prevalencia general del 22.6% (6); en Antioquia se encontró una prevaecía del 44% en el ganado lechero Holstein (12), mientras que un estudio comparativo de las razas lechera Holstein y BON obtuvo una prevalencia del 55.9% y 5% respectivamente (11). Los estudios estadísticos realizados en el actual trabajo presentaron una prevalencia del 8.5% en el ganado BON, sin embargo, a pesar de obtenerse un resultado más alto con respecto a los encontrados en artículos anteriormente nombrados, coincide en que la raza BON presenta menor prevaecía que la raza lechera Holstein, esto podría estar asociado a una posible tolerancia de la raza frete a la LBE.

Se presentó un resultado estadísticamente significativo sobre la rotación continua de animales en predios que seropositivos frente a la LBE por lo que resultó ser un factor de riesgo importante (13), sin embargo, otro estudio no presentó resultados significativos frente a la raza, edad o análisis de sangre como factores de riesgo (14). Los artículos anteriormente nombrados no tienen ninguna concordancia con los resultados obtenidos en el presente trabajo, por lo que no se logró determinar la causa de la alta prevalencia en los individuos nacidos antes del año 2009.

Los estudios realizados frente leucosis enzoótica bovina generalmente demuestran una disminución en la producción de los animales enfermos, debido a que esta patología afecta el sistema inmunológico y conlleva a que sean más susceptibles a diferentes enfermedades a las que se encuentren expuestos (12). Con el fin de tener resultados más acertados en el actual trabajo, se realizaron pruebas de PCR, teniendo en cuenta que este procedimiento se considera como un método confirmatorio por su alta sensibilidad al virus de la leucosis bovina (2). Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que, al contrario de los demás estudios, en este caso, los animales que presentan leucosis enzoótica bovina tuvieron un resultado estadísticamente significativo, indicando una ganancia de peso mayor que el resto de los individuos. Sin embargo, el resultado a pesar de ser significativo no fue extremadamente alto, por lo que se recomienda tomar la interpretación de estos resultados con mucho cuidado, ya que es posible que esta diferencia se deba a un efecto indirecto de otros parámetros no evaluados o mayor atención prestada por el ganadero a estos animales por su condición. Además, con el tamaño muestral de esta investigación no se puede tener el 100% de confiabilidad en los resultados obtenidos, por tanto, se recomienda tomar con cautela la interpretación de los datos finales.

Conclusiones y recomendaciones

Se logró concluir que la prevalencia del virus de la leucosis bovina en el ganado blanco orejinegro (BON) es aproximadamente del 8.5%, lo que es un resultado relativamente bajo respecto a otros reportes previos del país en otras razas. Adicionalmente se encontró el año de nacimiento como un factor de riesgo importante, siendo más frecuente esta enfermedad en animales más viejos. También se encontró un efecto significativo de la infección sobre el peso al destete.

Se recomienda realizar un estudio con mayor número de individuos, con el fin de obtener una mayor confiabilidad y precisión en los resultados, para así mismo tener adecuadas recomendaciones a partir del efecto sobre el peso al destete.

Agradecimientos

El presente estudio fue financiado por COLCIENCIAS bajo el proyecto: “conociendo nuestros recursos criollos, análisis genómico y búsqueda de regiones del genoma asociadas a características productivas, reproductivas y de salud en ganado Blanco Orejinegro (BON)”. Agradecimientos a mi tutor el profesor Juan Carlos Rincón Flórez, igualmente agradecimientos al programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Tecnológica de Pereira, quienes dieron el apoyo económico y técnico para poder llevar a cabo esta investigación.

Bibliografía

1. Hernández-Herrera DY, Posso-Terranova AM, Benavides JA, Muñoz-Flórez JE, Giovambattista G, Álvarez-Franco LÁ. Detección del virus de la leucosis bovina en ganado criollo colombiano mediante PCR-anidado. Acta Agronómica [Internet]. 2011 [cited 2019 Apr 3];60(4):312–8. Available from: https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/28845/29135
2. González E, Oliva G, Valera A, Bonzo E, Licursi M, Etcheverrigaray M. Leucosis enzoótica bovina: evaluación de técnicas de diagnóstico (id, elisa-i, wb, pcr) en bovinos inoculados experimentalmente [Internet]. Vol. 21, González y col. 2001 [cited 2019 Apr 4]. Available from: http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/11131/Documento_completo____pdf?sequence=1&isAllowed=y
3. Carrero J, Martinez F, Tarazona A, Cepeda B. Prevalencia de seropositividad a leucosis bovina mediante la técnica diagnóstica de Elisa indirecta en hatos lecheros situados en Mesa de los Santos, Santander. Spei Domus [Internet]. 2014 [cited 2019 Apr 4];5(11):6–11. Available from: <https://revistas.ucc.edu.co/index.php/sp/article/view/590/558>
4. Organización mundial de sanidad animal. Leucosis bovina enzoótica. Man la OIE sobre Anim terretres [Internet]. 2004 [cited 2019 Apr 4];(9):503–13. Available from: <http://www.biblioteca.unlpam.edu.ar/pubpdf/revet/v13a02baruta.pdf>
5. Saldarriaga OA, Arango AE, Fabio N, Olivera M, Bedoya G, Ossa JE. Ganado Blanco Orejinegro (BON): Una alternativa para la producción en Colombia. Rev Colomb Ciencias Pecu [Internet]. 2001 [cited 2019 Apr 4];14(2):121–8. Available from: http://tesis.udea.edu.co/bitstream/10495/6826/1/OssaJorge_2001_GanadoBlancoOrejinegro.pdf
6. Meza-Barreto G, Sanjuanelo-Corredor DW, Gallego-Marín MI. Detección molecular del virus de la leucosis bovina: un estudio por conglomerados en

- Colombia. Cienc y Agric [Internet]. 2018 [cited 2019 Apr 3];13(2):47–55. Available from:
https://revistas.uptc.edu.co/index.php/ciencia_agricultura/article/view/5552/4584
7. Polat M, Takeshima S nosuke, Hosomichi K, Kim J, Miyasaka T, Yamada K, et al. A new genotype of bovine leukemia virus in South America identified by NGS-based whole genome sequencing and molecular evolutionary genetic analysis. Retrovirology [Internet]. 2016 Dec 12 [cited 2019 Apr 3];13(1):4. Available from: <http://www.retrovirology.com/content/13/1/4>
 8. S1 GO. Efectos Del Medio Y La Herencia Sobre El Peso Al Destete De Terneros De La Raza Romosinuano. Rev Mvz Cordoba [Internet]. 2005;10(2):673–83. Available from: <file:///C:/Users/KATHERINE/Downloads/471-Texto del artículo-891-1-10-20160427.pdf>
 9. Martínez R, Onofre G, Polanco N. Parámetros genéticos y tendencias para características de crecimiento en el ganado criollo sanmartinero en los Llanos Orientales de Colombia. Corpoica Cienc y Technol Agropecu [Internet]. 2009;10(2):196. Available from: <https://www.redalyc.org/pdf/4499/449945027007.pdf>
 10. Cañas JJ, Ramírez J, Arboleda O, Ochoa J, Vergara O, Cerón M. Estimación de parámetros genéticos para peso al destete en ganado blanco orejinegro (bon) en el noroccidente colombiano. Rev MVZ Córdoba. 2018;13(1):1138–45.
 11. Úsuga-Monroy C, Echeverri JJ, López-Herrera A. El componente racial influencia la resistencia a la infección con el virus de la leucosis bovina. Rev la Fac Med Vet y Zootec [Internet]. 2018 [cited 2019 Apr 3];65(2). Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/rfmvz/v65n2/0120-2952-rfmvz-65-02-130.pdf>
 12. López-Herrera J. Diagnóstico molecular del virus de leucosis bovina en una población de vacas Holstein, Colombia Palabras clave adicionales. 2015; Available from: <https://www.redalyc.org/pdf/495/49543393011.pdf>

13. ALFONSO R, ALMANSA JE, BARRERA J. del C. Prevalencia serológica y evaluación de los factores de riesgos de leucosis bovina enzoótica en la Sabana de Bogotá y los Valles de Ubaté y de Chiquinquirá, Colombia. Rev Sci Tech l'OIE [Internet]. 1998;17(3):723–32. Available from: <https://www.oie.int/doc/ged/D9221.PDF>
14. Vol A, R NAB, R YAN, Pulido-medellín MO, Andrade-becerra RJ. Determinación serológica de leucosis bovina enzoótica en novillas de levante y vacas adultas de la vereda Morichal , Yopal , Casanare Serological determination of enzootic bovine leukosis in raise heifers and adult cows of the Morichal path in. 2013;10:31–7.

Anexos